

# 酱香型高温大曲中功能菌 $B_{3-1}$ 菌株的分离、选育及其分类学鉴定

庄名扬 王仲文

(中国科学院成都生物研究所,四川 成都 610041)

**摘要:** 以酱香型白酒生产所使用的高温大曲为含菌样品,经分离获多株耐高温细菌,对它们进行生化及香气特征测定,确认 $B_{3-1}$ 菌株为主要功能菌。经形态特征、生理生化特征的测定, $B_{3-1}$ 菌株归属于地衣芽孢杆菌。

**关键词:** 高温大曲; 酱香功能菌; 分离; 分类鉴定; 地衣芽孢杆菌

中图分类号: TS261.1; TQ925.7; TS262.33 文献标识码: A 文章编号: 1001-9286(2003)03-0027-02

## Separation, Breeding Selection and Taxonomic Determination of Functional Bacteria Strain $B_{3-1}$ from High Temperature Daqu Starter for Maotai-flavor Liquors

ZHUANG Ming-yang and WANG Zhong-wen

(Chengdu Biology Research Institute of CAS, Chengdu, Sichuan 610041, China)

**Abstract:** High temperature Daqu starter, applied in the production of Maotai-flavor liquors, was used as samples. And multiple strains of high temperature resistant bacteria were obtained through separation of the samples. Then the biochemical properties and the flavor characteristics of the strains were determined and the strain  $B_{3-1}$  was affirmed the main functional bacteria and it belongs to *Bacillus licheniformis* Chester by the determination of its conformation and biochemical properties. (Tran. by YUE Yang)

**Key words:** high temperature Daqu starter; Maotai-flavor functional bacteria; separation; taxonomic determination; *Bacillus licheniformis* Chester

幽雅细腻、回味悠长的酱香白酒,深受国内外消费者喜爱和青睐。就酱香型酒的微生物——酶学研究而言,不少科研和企业单位做了大量的研究工作,积累了许多宝贵的资料,但酱香功能菌的研究报道,却不多见。本文为笔者对酱香型白酒高温大曲酱香功能菌的分离、选育及其分类学鉴定总结。

### 1 酱香功能菌分离

#### 1.1 分离材料

酱香型白酒的酱香物质主要来源于酱香高温曲药,这是酒界同行的共同认识。因此,酱香功能菌的分离材料不应是酒糟、黄水、窖泥或其他酿酒原材料,而应该选用酱香高温曲药。

#### 1.2 分离培养基

1.2.1 麦芽汁琼脂 麦芽汁(6~7波美),琼脂2%,pH5.5,0.1 MPa灭菌30 min。

1.2.2 肉膏蛋白胨琼脂 牛肉膏0.3%,蛋白胨1.0%,NaCl 0.5%,琼脂2.0%,pH7.0,0.1 MPa灭菌30 min。

#### 1.3 分离方法

1.3.1 曲粉划线分离法 将少量酿制“酱酒”用的优质酱香高温曲药,在灭菌研钵中研细,用灭菌后的接种针针尖沾取极微量的曲

粉,在麦芽汁琼脂平皿中快速划线,于40~45℃下培养24~48 h。待平皿琼脂中出现分散的菌落时,有选择地挑起有代表性、出现率较多,或菌落形态有明显差异的菌落,移入蛋白胨肉膏斜面中培养,经数次转管纯化后,即得纯菌种。常规编号,保存备用。

1.3.2 稀释平皿涂布法 取0.1 g上述曲粉,置于装有50 ml灭菌水的三角瓶中,充分振荡,静置片刻后,取0.1 ml上浊液于麦芽汁或肉膏琼脂平皿中,常规涂布,经40~45℃培养24~48 h后,按前述要求将挑选出的菌落转入相应的琼脂平皿中,如上法培养,转管纯化后,亦得纯菌株,常规编号,保存备用。

我们用上述两种分离方法,分离纯化出外观形态有明显差异的 $B_1$ 、 $B_3$ 、CH 3大类细菌共数十株。

### 2 酱香功能菌的认定

所分离出的3大类细菌,哪一类菌株是“酱酒”酱香功能菌呢?为此,我们设计了如下试验,其结果如表1。

从表1可见,由酱香高温曲药中分离出的3类细菌,都有一定的糖化、液化力和蛋白分解力,只是其强弱不同而已。但用含丰富氮源的液体和固体培养基培养时,只有 $B_3$ 类菌株产生酱香,其余菌株只产生芝麻香,酱香很淡或根本没有。并且只有 $B_3$ 类菌株产生2,3-

收稿日期:2002-12-24

作者简介:庄名扬(1940-),男,江苏通州市人,大学本科,研究员,中心主任,从事药物化学及酿酒微生物研究工作多年,获得多项创造性成果,对提高中国白酒质量与产量作出了卓有成效的贡献,获国内贸易部、四川省、成都市多项科技进步奖,出版有《低度浓香大曲酒生产技术》专著,发表学术论文30余篇。

表1 酱香功能菌的认定

项目	菌株编号							备注
	B <sub>1-1</sub>	B <sub>1-2</sub>	B <sub>1-3</sub>	B <sub>3</sub>	CH-1	CH-2	CH-3	
糖化力(mg 淀粉/g 干曲)	44	275	57	20	64	102	180	均为4~6次测定平均值
液化力(g 淀粉/g 干曲)	0.39	2.11	0.44	0.53	0.62	0.38	5.2	
蛋白分解力(g 蛋白/100 g 干曲)	280	140	5475	133.5	83.3	65.0	5.0	
液体培养(△)产香味	芝麻香	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++
	酱香	-	-	-	+++	-	-	-
固体培养(△△)产香味	芝麻香	++++	++++	++++	+	++++	++++	++++
	酱香	±	±	±	++++	±	±	±
产生2,3-丁二醇(定性反应)	-	/	/	+	-	/	/	

△:玉米浆1%,牛肉膏0.5%,NaCl0.5%;△△:麸皮99%,葡萄糖1%,固体:水=100:70;++++明显浓香味,+++浓香味,++较浓香味,+弱香味,±微香味。

丁二醇,其余菌株均不产生。因此,我们认定,“酱酒”曲药中的酱香功能菌为B<sub>3</sub>类菌株。

3 B<sub>3-1</sub>菌株的分类学鉴定

将B<sub>3</sub>类菌株从外观形态、菌落特征、镜检形态及所产生香味类别等特征进行严格选择,最后确定B<sub>3-1</sub>菌株为B<sub>3</sub>类菌株的纯种代表菌株,并对该菌株进行生物学分类鉴定。

对B<sub>3-1</sub>菌株进行生物学分类鉴定的主要依据是:《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)<sup>[1]</sup>;《美RE戈登著《芽孢杆菌属》》<sup>[2]</sup>。参改依据为王大耜编著《细菌分类基础》<sup>[3]</sup>,方心芳编著《应用微生物实验方法》<sup>[4]</sup>,《奥V.B.D斯尔克曼著《细菌属的鉴定指导》》<sup>[5]</sup>。该株细菌的培养特征按常规方法,显微特征用光学显微镜和透射电子显微镜;其他生理生化特征按上述资料的有关条目进行。

3.1 科属的鉴定

B<sub>3-1</sub>菌株菌体杆状,单生,革兰氏染色阳性,接触酶阳性,形成内生孢子,抗酸复红染色阳性,孢子呈红色。据《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)应属芽孢杆菌科(Bacillaceae Fischel),芽孢杆菌属(Bacillus)。

3.2 种的鉴定

3.2.1 形态特征 菌体杆状,单生,电镜测量大小为0.87×1.43 μm(平均),复红染色均匀,未见不着色脂肪粒,抗酸复红染色阳性,芽孢红色。孢囊不膨大,芽孢椭圆形,中生或次中生。

3.2.2 培养特征 在琼脂培养平板上,该菌株菌落呈圆形,边缘稍有缺刻,灰白色,厚实,湿润,培养5~7 d后,菌落产生色素,培养基呈红褐色。在葡萄糖和淀粉培养基上,菌落生长极为迅速,产生色素,培养基呈淡粉红色或红褐色,菌落湿润,平坦或厚实,无皱纹,边缘缺刻至明显,缺刻呈羽毛状。

3.2.3 生理生化特征 B<sub>3-1</sub>菌株的生理生化特征与《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)和《芽孢杆菌属》中的地衣芽孢杆菌的生理生化特征见表2。

综上所述,从B<sub>3-1</sub>菌株的形态、培养和生理生化特征可见,该菌株与《伯杰细菌鉴定手册》(第八版)和《芽孢杆菌属》中所描述的地衣芽孢杆菌的绝大部分特征相同,因此,该菌株的生物学分类为地衣芽孢杆菌。但是该菌株在利用阿拉伯糖产酸和石蕊酸性反应等两项生化特征又与上述两专著中所述不同,故B<sub>3-1</sub>菌株生物分类鉴定命名为地衣芽孢杆菌酱香B<sub>3-1</sub>菌株(Bacillus licheniformis (酱香)B<sub>3-1</sub>)。

参考文献:

表2 B<sub>3-1</sub>菌株的生理生化特征

序号	生理生化特征	《伯杰细菌鉴定手册》地衣芽孢杆菌	《芽孢杆菌属》地衣芽孢杆菌	B <sub>3-1</sub> 菌株	
1	杆菌	宽(μm)	0.6~0.8	0.6~0.8	0.87
		长(μm)	1.5~3.8	1.5~3.0	1.43
2	革兰氏反应		+	+	+
3	原生质不着色小球		-	-	-
4	孢子椭圆或柱形		+	+	+
	中生或近中生		+	+	+
5	运动性		+	+	+
	接触酶		+	+	+
6	厌氧生长		+	+	+
	V.P反应		+	+	+
7	V.P反应培养液pH值		/	5.0~6.5	6.0
	生长最高温度(℃)		50~55	50~55	50
8	最低温度(℃)		15	15	/
	溶菌酶(0.001%)		-	-	/
9	培养基pH5.7		+	+	+
	叠氮化合物0.02%		-	-	/
10	产酸 葡萄糖		+	+	+
	阿拉伯糖		+	+	-
11	木糖		+	+	+
	甘露醇		+	+	+
12	水解淀粉		+	+	+
	马尿酸		-	-	/
13	利用柠檬酸盐		+	+	+
	丙酸盐		/	+	+
14	NO <sub>3</sub> 产生NO		+	+	+
	分解酪素		+	+	+
15	酪氨酸		-	-	-
	石蕊酸性反应		/	-	-
16	还原反应		/	+	+
	卵黄反应		-	-	-

[1] 伯杰.伯杰细菌鉴定手册(第八版)[M].北京:科学出版社,1984.  
 [2] R.E戈登.芽孢杆菌属[M].  
 [3] 王大耜.细菌分类基础[M].北京:科学出版社,1977.  
 [4] 方心芳.应用微生物实验方法[M].  
 [5] V. B. D斯尔克曼.细菌属的鉴定指导[M].北京:科学出版社,1978.